
高田充歯科基礎医学奨励賞 受賞講演

特定波長光の照射による *Porphyromonas gingivalis* の増殖抑制効果

福井 誠

キーワード：光線力学療法, *Porphyromonas gingivalis*, 歯周病

Specific-wavelength Visible Light Irradiation Inhibits Bacterial Growth of *Porphyromonas gingivalis*

Makoto FUKUI

Abstract : Photodynamic therapy was originally reported as a treatment of malignant tumors using photosensitive agents (photosensitizers) and visible light irradiation. When a tumor tissue containing a photosensitizer is irradiated with light of an appropriate wavelength and dose, a photochemical reaction is induced and the activated photosensitizer produces free radicals that damage cells and cause necrosis of the tumor. Recently, this technique has also been shown to be effective for inhibiting bacterial growth. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogenic bacterium, produces endogenous protoporphyrin by degrading hemoglobin for its growth, which could make this bacterium photosensitive. Therefore, photodynamic therapy for periodontal diseases targeting this bacterium without using exogenous photosensitizer is expected. The effects of light irradiation on *P. gingivalis* have been reported, however the optimal irradiation condition remains to be determined in terms of the light sources, wavelength, and other parameters. Recently, we demonstrated that *P. gingivalis* growth was inhibited by visible laser light irradiation at 405 nm and an energy density of 15 J/cm² without the use of any exogenous photosensitizers. These findings suggest that photodynamic therapy without any exogenous photosensitizer is a promising novel technology for the control of periodontal diseases.

1. はじめに

光線力学療法 (Photo Dynamic Therapy) は1990年代以降に腫瘍の治療において導入されてきた治療法であり、腫瘍親和性の高い光感受性薬剤を生体に注入し、腫瘍組織への集積が最大になったときに特定波長の高エネルギー可視光線であるレーザー光を照射し、その光エネルギーによって引き起こされる光化学反応により活性酸素などのフリーラジカルを生成し腫瘍細胞を変成・壊死させる、ターゲット腫瘍に限定した治療効果が発揮できる療法である^{1,2)}。光線力学療法は腫瘍のみならず、細菌に対する光線力学療法もいくつかの研究により報告がな

されており³⁻⁶⁾、細菌感染制御における応用が期待されている。

歯周病はさまざまな細菌の混合感染によって発症・進展する疾患である。歯周病原細菌のうち、*Porphyromonas gingivalis* は、タンパク質分解酵素などの病原因子を数多く保有する偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり⁷⁻⁹⁾、その病原性が歯周病の発症・進展に大きく関与しているとされている。そのため、同菌を標的とした歯周病の治療・予防法の開発が期待される。現行の治療法である機械的なスクレーピング・ルートプレーニングや非特異的な抗菌薬の利用などでは、十分な効果を得られ

ないことがあり、そのため、方法が簡単で、患者にとっても負担が少なく、さらに繰り返して行うことができる代替処置の登場が長い間求められてきた。

これまでに *P. gingivalis* を含めた歯周病原菌に対して、トリイジンブルーやメチレンブルー、5-アミノレブリン酸など、外来性の光感受性薬剤を使用した光線力学療法についての報告があり^{5,6)}、歯周病の新たな治療・予防法として光線力学療法の応用の可能性が考えられる。しかしながら、外来性の光感受性薬剤の使用による光線過敏など、臨床応用においては宿主に対する影響も懸念されるため¹⁰⁾、歯周病治療の代替療法として臨床応用するためには、外来性の光感受性薬剤を使用することのない光線力学療法の開発が求められる。

本稿では、外来性光感受性薬剤を用いない抗菌光線力学療法の開発の現状を解説するとともに、*P. gingivalis* を標的とした新たな歯周病代替治療法の可能性を、我々の結果を示しつつ議論したい。

2. 細菌の菌体内在性光感受性物質を利用した光線力学療法

皮膚炎の原因菌となる *Propionibacterium acnes* に対する光線力学療法に関する研究では、外部から光感受性薬剤を投与するのではなく、その菌体内に産生されるポルフィリンを光線力学療法のターゲットとして、407–420 nm の青色光を 90 mW/cm²×60分、総じて 324 J/cm² の光照射を行うことにより、同菌の増殖抑制がみられたと報告されている¹¹⁾。

P. gingivalis はその増殖において鉄要求性の細菌であり、宿主の赤血球のヘモグロビンを鉄供給源とする。ヘモグロビンを構成するヘムはプロトポルフィリン IX と鉄の複合体であり、菌体内に取り込まれたヘムより鉄が離脱した結果、プロトポルフィリン IX が生じる¹²⁾。このプロトポルフィリン IX は先に述べたポルフィリン同様、光感受性を持つため、内在性の光感受性物質をターゲットとした光線力学療法の対象となる可能性がある。

細菌の内在性の光感受性物質を標的として光照射を行った研究では、細菌がその代謝過程で内在的に産生されるポルフィリンが光感受性物質として働き、光照射により増殖抑制に至る可能性があるとの報告がある¹³⁻¹⁵⁾。それらの報告では、光源として 380–520 nm や 488–514 nm のランプ光、455 nm あるいは 625 nm のレーザー光が使用されており、照射された光エネルギーも数十～数百 J/cm² と報告によって様々である。

このように、細菌の内在性の光感受性物質をターゲットとした光線力学療法の可能性が示されているが、その光源や照射波長などは報告によって一定しておらず、至適照射条件は不明のままである。そこで、我々はまず *P. gingivalis* に対する広範囲波長の光照射をおこない、その増殖抑制効果を発揮する光波長の特定を行った。

3. *P. gingivalis* の増殖抑制効果に対する至適波長の検索

血液寒天培地にて継代培養した *P. gingivalis* ATCC 33277株を Brain Heart Infusion 液体培地（以下 BHI プロス）10 ml にて37℃、24時間嫌気培養を行い、血液寒天培地上に播種し24時間経過したコロニーに、外来性光感受性物質を用いて行われる光線力学療法において、ポルフィリンの励起波長として利用されている、405 nm および 630 nm のレーザー光を、光強度密度 50 mW/cm²で照射した後に培養した。その結果、405 nm で3～6分照射した場合にコロニーの成長抑制が見られた。可視領域光線で *P. gingivalis* の増殖抑制効果を示す波長についてより詳細に検討するため、愛知県岡崎市の基礎生物学研究所の大型スペクトログラフ¹⁶⁾を利用して可視光レーザーを広範囲の波長域で10～20 nm 間隔で照射した。具体的には、先の実験の結果に基づいて、効果の見られた光強度密度 (50 mW/cm²)、照射時間 (6分) による光エネルギー密度 (18 J/cm²) を満たすよう、各波長で光強度を測定、照射時間による調整を行い、*P. gingivalis* コロニーに光照射を行った。血液寒天培地にて培養した *P. gingivalis* を BHI プロス 10 ml にて37℃、24時間嫌気培養を行った後、血液寒天培地上に3点播種し、更に30時間嫌気培養後、400 nm 以上の可視領域の光を照射した。照射後、嫌気培養を行い、コロニーサイズの測定を行い、効果を判定した。その結果、400 nm および、410 nm の波長において、430–480 nm の波長域のもの、およびコントロール群に対してコロニーサイズが小さいことが明らかとなり、400–410 nm 光照射で、*P. gingivalis* に対する最大の増殖抑制効果が得られることが確認できた (図1)。また、500–700 nm の波長域の光照射も行っているが、この領域では増殖抑制効果は見られなかった。外来性光感受性薬剤として5-アミノレブリン酸を使用すると、生体内でヘム合成の過程においてプロトポルフィリン IX が大量に生成されるが、このプロトポルフィリン IX は光感受性物質であり、405 nm 付近の青色光を照射すると励起作用によりフリーラジカルが生成される。本研究結果からもプロトポルフィリン IX に対する励起光波長である 405 nm が、*P. gingivalis* の増殖抑制に対する最大の効果を発揮する波長であることが確認された。

4. 405 nm レーザー光照射による *P. gingivalis* の増殖抑制効果に対する至適照射条件の検索

大型スペクトラムを用いた至適波長検索結果から、400–410 nm の光照射で *P. gingivalis* の増殖抑制効果が得られ、ターゲットとされるべき光波長が 405 nm であることがわかったため、405 nm レーザー照射器（ウシオ電機、東京）を用いて、*P. gingivalis* の増殖抑制効果に対する至適照射条件の検索を行った。

そのため、BHI プロスにて培養した *P. gingivalis* 菌液

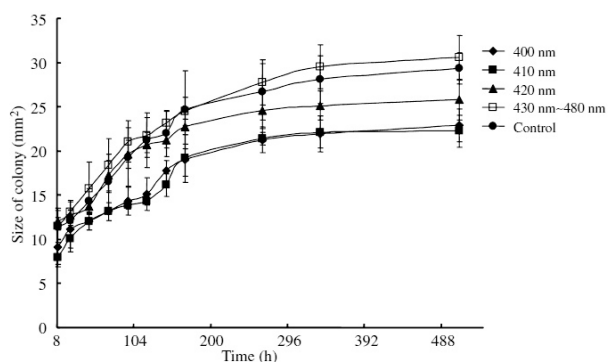


図1 *P. gingivalis* の増殖に対する広範囲波長域光照射の影響 (文献22より引用)

血液寒天培地にて培養した *P. gingivalis* を BHI プロス 10 ml にて 37℃, 24 時間嫌気培養を行った後, 血液寒天培地上に 3 点播種し, 更に 30 時間嫌気培養後, 大型スペクトログラフにより 400 nm 以上の可視領域の光を 10~20 nm 間隔で照射した。予備実験で十分に効果の見られた, 強度密度 (50 mW/cm²), 照射時間 (6 分) による光エネルギー密度 (18 J/cm²) を満たすよう, 各波長で光強度を測定, 照射時間による調整を行い, 光照射を行った。照射後, 嫌気培養を行い, コロニーサイズの測定を行い, 効果を判定した。その結果, 400 nm および, 410 nm の波長において, 430 nm 以上の波長域のもの, およびコントロール群に対してコロニーサイズが小さいことが明らかとなり, 400~410 nm の光照射で, *P. gingivalis* に対する最大の増殖抑制効果が得られることが確認できた²²⁾。

に以下に記す各条件の下, レーザー照射を行い照射後, 37℃にて嫌気培養を行い, 経時的に菌液の濁度 (OD₆₅₅) を測定して菌の増殖をモニタリングした。

まず, 光エネルギー密度一定 (15 J/cm²) を満たす, 3 通りの光強度密度, 光照射時間の組み合わせ (50 mW/cm² × 5 分, 200 mW/cm² × 75 秒, 400 mW/cm² × 38 秒) による照射を行い, *P. gingivalis* の増殖に対する影響を観察した。その結果, いずれの条件でも増殖を抑制していること (48 時間培養の時点で約 65~80% の抑制) が確認できた。(図 2)

続いて, 光強度密度一定 (50 mW/cm²) で照射を行ったときの, 光照射時間による影響について調べた。その結果, 照射時間 1 分でも有意な増殖抑制効果 (約 30% の抑制) が認められ, 2 分以上の照射時間でより強い増殖抑制 (36 時間培養の時点で約 70% 以上の抑制) が確認できた。(図 3)

更に, 照射時間一定 (5 分) で照射を行ったときの, 強度密度による影響について調べた。その結果, 光強度密度 30 mW/cm² でも有意な増殖抑制効果 (36 時間培養の時点で約 70% の抑制) が認められた。また, 50 mW/cm²

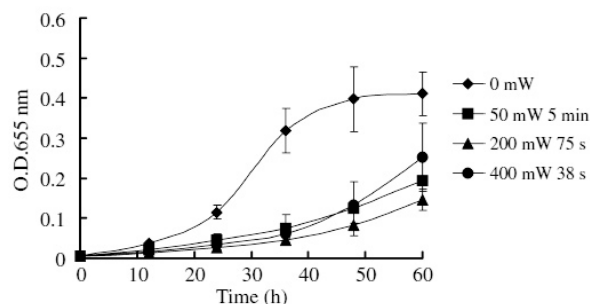


図2 光エネルギー密度一定 (15 J/cm²) での 405 nm レーザー光照射による *P. gingivalis* の増殖に対する影響 (文献22より引用)

BHI プロスにて培養した *P. gingivalis* 菌液に光エネルギー密度一定 (15 J/cm²) で照射を行い, 3 通りの光強度密度, 光照射時間の組み合わせ (50 mW/cm² × 5 分, 200 mW/cm² × 75 秒, 400 mW/cm² × 38 秒) によるレーザー照射を行った。照射後, 37℃にて嫌気培養を行い, 経時的に菌液の濁度 (OD₆₅₅) を測定して菌の増殖をモニタリングした。その結果, いずれの条件でも *P. gingivalis* の増殖を抑制すること (48 時間培養の時点で約 65~80% の抑制) が確認できた²²⁾。

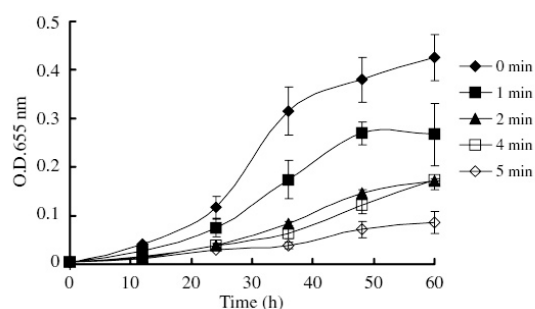


図3 光強度密度一定 (50 mW/cm²) での 405 nm レーザー光照射による *P. gingivalis* の増殖に対する光照射時間の影響 (文献22より引用)

BHI プロスにて培養した *P. gingivalis* 菌液に光強度密度一定 (50 mW/cm²) で, 照射時間を変化させて 405 nm レーザー光照射を行い, 照射後, 37℃にて嫌気培養を行い, 経時的に菌液の濁度 (OD₆₅₅) を測定して菌の増殖をモニタリングした。その結果, 照射時間 1 分でも有意な増殖抑制効果 (約 30% の抑制) が認められ, 2 分以上の照射時間でより強い増殖抑制 (36 時間培養の時点で約 70% 以上の抑制) が確認できた²²⁾。

では 100 mW/cm² と同程度の抑制効果が認められ, 36 時間培養の時点で約 90% 近い増殖抑制効果が認められた。(図 4)

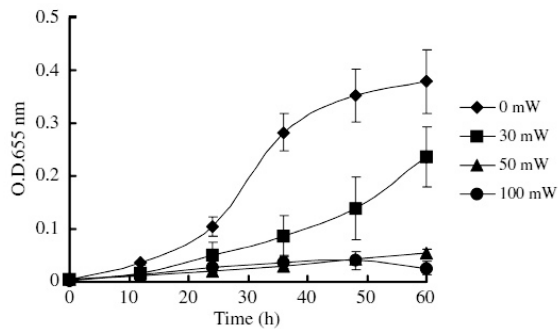


図4 照射時間一定（5分）での405 nmレーザー光照射による *P. gingivalis* の増殖に対する光強度密度の影響（文献22より引用）

BHI ブロスにて培養した *P. gingivalis* 菌液に照射時間一定（5分）で、光強度密度を変化させて405 nmレーザー光照射を行い、照射後、37℃にて嫌気培養を行い、経時的に菌液の濁度（OD₆₅₅）を測定して菌の増殖をモニタリングした。その結果、強度密度 30 mW/cm²でも有意な増殖抑制効果（36時間培養の時点で約70%の抑制）が認められた。また、50 mW/cm²では 100 mW/cm²と同程度の抑制効果が認められ、36時間培養の時点で約90%近い増殖抑制効果が認められた²²⁾。

5. 考 察

以上のように、外来性光感受性薬剤を使用することなく、405 nmのレーザー光を照射することのみで *P. gingivalis* の増殖を抑制することが示された。特定波長の光照射による *P. gingivalis* の増殖抑制のメカニズムについて、その仮説を図5に記す。*P. gingivalis* は鉄要求性の細菌であり、宿主の赤血球のヘモグロビンを分解し、プロトポルフィリンIXと鉄の複合体であるあるヘムを菌体内に取り込む¹²⁾。菌体内でヘムより鉄が離脱することによりプロトポルフィリンIXに変化するが、このプロトポルフィリンIXは光感受性物質であり、405 nm付近の青色光を照射すると励起作用によりフリーラジカルを生じる。この発生したフリーラジカルにより *P. gingivalis* が障害を受けると考えられる。

P. gingivalis の産生するタンパク質分解酵素の Arg-gingipain と Lys-gingipain は、血球凝集活性、バイオフィルム形成および様々な細胞毒性などに関与することから本細菌の毒性因子として注目されている¹⁷⁾。また、Arg-gingipain と Lys-gingipain は本菌が宿主のヘモグロビンを分解し、生育するための鉄を得るために必須な酵素でもあるので¹⁸⁾、*P. gingivalis* では、タンパク質分解活性が強く、すなわち病原性が高く活動性の高い菌株ほど、内在性の光感受性物質となるプロトポルフィリンIXを菌体内に高い水準で有していることが想定される。このことより、外来性の光感受性薬剤を使用しない光線力学療法は、*P. gingivalis* を選択的な標的とした、歯周病の継

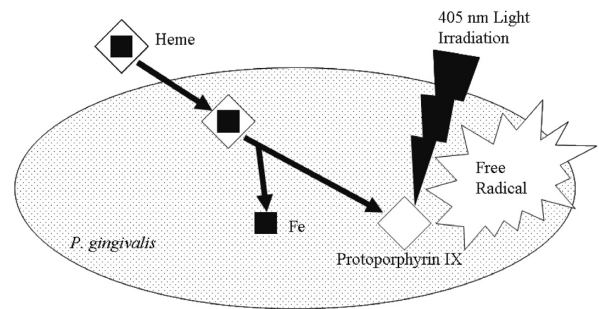


図5 特異的波長（405 nm）の光照射による *P. gingivalis* の増殖抑制のメカニズム（仮説）

P. gingivalis は鉄要求性の細菌であり、宿主の赤血球のヘモグロビンを分解し、プロトポルフィリンIXと鉄の複合体であるあるヘムを菌体内に取り込む。菌体内でヘムより鉄が離脱することによりプロトポルフィリンIXに変化するが、このプロトポルフィリンIXは光感受性物質であり、405 nm付近の青色光を照射すると励起作用によりフリーラジカルを生じる。この発生したフリーラジカルにより *P. gingivalis* が障害を受けると考えられる。

続的な治療戦略において効果的な治療・予防法であると考えられる。

また、菌の増殖段階によって光照射に対する感受性に違いがあるのかどうかを調べたところ、増殖の立ち上がりを示す前の状態（lag phase）にある菌が最も感受性が高く、増殖曲線が立ち上がった後の対数増殖期（log phase）にある菌では感受性が低いことが確認されている。このことより、本菌が歯周ポケット内で本格的な増殖を開始する前の段階において、光照射により本菌の増殖を抑制することにより、歯周病の予防法として効果的であると期待される。

歯周病原細菌は、宿主の上皮細胞などのタンパク質を分解することにより産生される揮発性硫黄化合物などの臭い物質を産生するため、口臭の原因ともなる¹⁹⁾。唾液を嫌気培養すると唾液中に含まれている歯周病原細菌から揮発性硫黄化合物が産生されるが、400–500 nmの光照射を行った唾液を培養すると揮発性硫黄化合物の産生が減少するという報告がある²⁰⁾。この報告では、*P. gingivalis* を含めた歯周病原細菌が光照射により他の細菌の代謝に影響を与えていることが示唆されている。*P. gingivalis* は強いタンパク質分解活性を有しており、宿主のタンパク質を小さいペプチドに分解する。そしてそのペプチド群は他のタンパク質分解活性の弱い細菌のエネルギー源となりうることから²¹⁾、*P. gingivalis* の増殖抑制により本菌以外の、*Fusobacterium* や *Peptostreptococcus* などの歯周病に関連する嫌気性細菌の増殖抑制にもつながっていると考えられる。そのため、*P. gingivalis* の代

謝や増殖を光照射によって制御することは、本菌以外の細菌群の制御にもつながり、口臭の制御においても大きな利点であると考えられる。

我々の研究において、405 nm の青色レーザー光照射によって、光感受性薬剤を使用することなく、*P. gingivalis* の増殖を抑制することができた。そして光線力学療法が歯周病の治療において重要と考えられる、同菌の歯周ポケット局所における制御において、有望な新しい処置となりえる可能性が示された。本研究で行ったレーザー光のみの光線力学療法では、外来性の光感受性薬剤を使用した報告に見られる有効な光エネルギー密度 (100 J/cm^2 以上)^{8,9)} に比べて遙かに低い 15 J/cm^2 でも効果があることが示された。我々はヒト歯肉線維芽細胞に 405 nm, 15 J/cm^2 の光エネルギー密度でレーザー光を照射しても、その生存率には影響がないことを確認している。しかしながら、生体組織に対する影響の評価はより慎重に行う必要があり、動物実験等により、*in vivo* でその影響を確認することが今後の課題である。

謝 辞

稿を終えるに臨み、懇切なる御校閲、御助言を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部予防歯学分野の伊藤博夫教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究の実施に際し、終始御指導を戴きました鶴見大学歯学部口腔内科学講座の里村一人教授、徳島大学歯学部口腔保健支援学講座の吉岡昌美准教授、ならびに中西宏彰博士を始めとしました本研究の円滑な進展に特別の御配慮を頂きました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Diamond I, Grancilli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB and Jaenicke R: Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet* 300, 1175-1177 (1972)
- 2) Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J and Peng Q: Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90, 889-905 (1998)
- 3) Malik Z, Hanania J and Nitzan Y: Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol* 5, 281-293 (1990)
- 4) Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A and Lambrecht B: Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol* 65, 441-445 (1997)
- 5) Packer S, Bhatti M, Burns T and Wilson M: Inactivation of proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* using light-activated agents. *Lasers Med Sci* 15, 24-30 (2000)
- 6) Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P and Wilson M: In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 932-940 (2003)
- 7) Sbordone L, Ramaglia I, Gulletta E and Iacono V: Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol* 61, 579-584 (1990)
- 8) Renvert S, Dahlen G and Wikstrom M: Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. Relation between microbiological and clinical parameters during 5 years. *J Periodontol* 67, 562-571 (1996)
- 9) Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC and Snyder B: Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 27, 897-903 (2000)
- 10) Malik Z, Landan H and Nitzan Y: Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B* 14, 262-266 (1992)
- 11) Kawada A, Aragane Y, Kameyama H, Sangen Y and Tezuka T: Acne phototherapy with a high-intensity, enhanced, narrowband, blue light source: an open study and in vitro investigation. *J Dermatol Sci* 30, 129-135 (2002)
- 12) Smalley JW, Birss AJ, Withnall R and Silver J: Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with oxyhaemoglobin and deoxyhaemoglobin. *Biochem J* 117, 741-744 (1992)
- 13) Henry CA, Judy M, Dyer B, Wagner M and Matthews JL: Sensitivity of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in liquid media to argon laser. *Photochem Photobiol* 61, 410-413 (1995)
- 14) Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, Doukas AG and Goodson JM: Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1391-1396 (2005)
- 15) Izzo AD and Walsh JT: Light-induced modulation of *Porphyromonas gingivalis* growth. *J Photochem Photobiol B* 77, 63-69 (2004)
- 16) Watanabe M, Furuya M, Miyoshi Y, Inoue Y, Iwahashi I and Matsumoto K: Design and performance of the Okazaki Large Spectrograph for photobiological research. *Photochem Photobiol* 36, 491-498 (1982)
- 17) Grenier D, Roy S, Chandad F, Plamondon P, Yoshioka M, Nakayama K and Mayrand D: Effect of inactivation of the Arg- and/or Lys gingipain gene on selected virulence and physiological properties of *Porphyromonas*

- gingivalis*. Infect Immun 71, 4742-4748 (2003)
- 18) Smalley JW, Thomas MF, Birss AJ, Withnall R and Silver J: A combination of both arginine- and lysine-specific gingipain activity of *Porphyromonas gingivalis* is necessary for the generation of the micro-oxo bishaem-containing pigment from haemoglobin. Biochem J 379, 833-840 (2004)
 - 19) Morita M and Wang HL: Association between oral malodor and adult periodontitis: a review. J Clin Periodontol 28, 813-819 (2001)
 - 20) Sterer N and Feuerstein O: Effect of visible light on malodor production by mixed oral microflora. J Med Microbiol 54, 1225-1229 (2005)
 - 21) Wei GX, Van der Hoeven JS, Smalley JW, Mikx FHM and Fan MW: Proteolysis and utilization of albumin by enrichment cultures of subgingival microbiota. Oral Microbiol Immunol 14, 348-351 (1999)
 - 22) Fukui M, Yoshioka M, Satomura K, Nakanishi H and Nagayama M: Specific-wavelength visible light irradiation inhibits bacterial growth of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res 43, 174-8 (2008)